

El factor inducible por la hipoxia y la actividad física

JUAN CAMILO CALDERÓN VÉLEZ, MD¹

RESUMEN

Los animales superiores dependen de un adecuado flujo de oxígeno. Los mecanismos involucrados en los procesos de percibir la hipoxia y responder a ella se han ido aclarando, desde hace unos 15 años, con el descubrimiento de las subunidades α y β del factor inducible por la hipoxia (HIF, por su sigla en inglés) y de las hidroxilasas involucradas en su regulación. Las especies reactivas de oxígeno (ERO), al parecer, también participan en el proceso de percibir y responder a la hipoxia.

Las células musculares podrían ser un modelo útil para estudiar la interrelación hipoxia-ERO-HIF- respuesta celular, con importantes implicaciones básico-clínicas. Sin embargo, apenas comienza el estudio de esta relación en el músculo esquelético. Se revisan en este artículo algunos aspectos interesantes de la investigación en el músculo esquelético y se plantean algunas preguntas e hipótesis que podrían ser evaluadas en este tipo de células.

PALABRAS CLAVE

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO
FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA

¹ Profesor, Departamento de Fisiología y Bioquímica, Grupo de Fisiología del Ejercicio, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Dirección actual: aspirante a Doctor en Fisiología y Biofísica, Laboratorio de Biofísica Muscular, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela, Colombia.
jcalderonv00@yahoo.com

Recibido: enero 18 de 2007

Aceptado: marzo 15 de 2007

SUMMARY

HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR AND PHYSICAL ACTIVITY

Higher animals depend on an adequate oxygen flux. Mechanisms involved in the process of sensing and responding to hypoxia have become clearer in the last 15 years with the discovery of the α y β hypoxia-inducible factor (HIF) subunits and hydroxylases involved in their regulation. Reactive oxygen species seem to play some role in the process of sensing and responding to hypoxia.

Skeletal muscle cells seem to be a suitable model for studying the hypoxia-reactive oxygen species-HIF-cellular response relationship. Its study has important basic and clinic implications. However, the study of this relationship just begins. Some interesting aspects regarding skeletal muscle research are reviewed in this article, and some questions and hypotheses suitable for being evaluated with muscle cells are discussed.

KEY WORDS

HIPOXIA
HIPOXIA-INDUCIBLE FACTOR
REACTIVE OXYGEN SPECIES
SKELETAL MUSCLE

En los organismos superiores el oxígeno juega un papel muy importante como aceptor de electrones en la larga cadena de reacciones que ocurre para obtener energía en forma de adenosín trifosfato

(ATP). Niveles bajos de oxígeno llevan a la hipoxia tisular y los altos, a la hiperoxia; en ambos estados se presentan consecuencias tan graves como la muerte celular. En los últimos 15 años se han descubierto las proteínas maestras y los principales mecanismos involucrados en los procesos de percibir y regular las concentraciones de oxígeno en los tejidos. En las células tienen un papel preponderante el factor inducible por la hipoxia (HIF, por Hypoxia-inducible factor) y las hidroxilasas: prolil hidroxilasas (PHD —prolyl hydroxylase domain-containing protein—) y asparaginil hidroxilasa (FIH —factor-inhibiting HIF-1—).

El HIF es un factor de transcripción heterodimérico, ampliamente expresado en los tejidos humanos, compuesto por una subunidad α y una β . Se conocen tres isoformas de la subunidad α (1α , 2α y 3α) de la cual se sabe que es inestable en condiciones de normoxia; de la subunidad β , que es constitutiva, se conoce una variante (1β). El HIF-1 regula la expresión de al menos 70 genes diferentes.¹

Las hidroxilasas, que son las verdaderas sensoras del oxígeno, actúan como estabilizadoras y activadoras del HIF. En artículos recientes se revisan con alguna profundidad el mecanismo sensor de oxígeno, las funciones del HIF y su regulación por las hidroxilasas.¹⁻⁶

En el presente texto se hace un breve análisis sobre la hipoxia y la actividad física y muscular, se señalan algunos aspectos pendientes de investigar al respecto y se propone el modelo muscular como uno de los que reúnen las características necesarias para el estudio de la relación oxígeno-especies reactivas de oxígeno (ERO)-HIF.

El factor inducible por hipoxia y la actividad física

Durante la actividad física hay un gran aumento del consumo de oxígeno, independientemente del tipo y de la intensidad del ejercicio,^{7,8} a pesar de lo cual,

debido a la gran tensión generada por los músculos durante las contracciones máximas o submáximas, a diferentes intensidades, en realidad no hay un fenómeno global de hiperoxia, sino de isquemia-reperusión, o en otras palabras, ciclos probables de hipoxia-hiperoxia.⁸⁻¹⁰

Ahora bien, durante la actividad física moderada o intensa el músculo y el organismo en general se ven sometidos a un gran estrés oxidativo y aunque algunos trabajos sobre los que se basa esta idea tienen problemas metodológicos,¹¹ se acepta que la actividad física se asocia con un aumento significativo, al menos al doble, en la generación de radicales libres y ERO medidos según varios índices de peroxidación lipídica.¹²⁻¹⁴

No está claro si en el músculo esquelético (y en otras células) el fenómeno que se asocia al aumento de los radicales libres es la hipoxia o la hiperoxia.^{2,15} El aumento de las ERO con los ciclos hipoxia-hiperoxia se ha relacionado en el músculo con la fatiga y el daño,^{16,17} y se ha propuesto a los radicales libres como posibles mediadores de la respuesta celular a la hipoxia.¹⁸ Sin embargo, aún no es posible entender la relación hipoxia-hiperoxia-ERO-HIF-señalización intracelular, ni en el músculo esquelético ni en otras células.

Surgen algunos interrogantes luego de la publicación reciente de un trabajo que evaluó la respuesta del músculo a la hipoxia midiendo los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del HIF-1 α .^{19,20} En este trabajo se evaluaron 30 hombres después de ser entrenados durante seis semanas en un cicloergómetro. Catorce de ellos entrenaron en un ambiente que permanecía hipóxico (en condiciones similares a las que se dan a una altitud de 3.850 m) sólo durante el período de la realización de la actividad física y se comparó su respuesta con la de los sujetos control, que entrenaron en un ambiente normóxico. Los niveles de ARNm del HIF-1 α se elevaron significativamente sólo en los sujetos entrenados a baja y alta intensidad en ambientes

hipóxicos (aumentos entre 58 y 82% según la intensidad del ejercicio), en comparación con el otro grupo.^{19,20} No hubo cambios en el ARNm de la subunidad β .

Lo anterior es interesante porque plantea varias preguntas: si no hay aumento del HIF con el entrenamiento en ambientes normóxicos, ¿realmente qué tan hipóxico es el tejido muscular durante el ejercicio?, ¿cuál es, en este caso, el umbral de hipoxia para que se active la transcripción del HIF?, ¿si no se activa la transcripción del HIF, cuáles otros estímulos median las respuestas que se observan con el entrenamiento, como el aumento de la masa eritrocitaria (que es mediado por un incremento de la eritropoyetina, cuyo gen está bajo control del HIF)?, ¿cuál es el curso en el tiempo de los cambios del HIF con el ejercicio y el entrenamiento?

El aumento del ARNm de otras proteínas como la fosfofructoquinasa, enzima clave en la glucólisis, ocurrió sólo en el caso de ejercicio en hipoxia a alta intensidad. De nuevo surgen preguntas: ¿cómo regula entonces el músculo las proteínas que, según se sabe, aumentan como adaptación al ejercicio?, ¿es insuficiente el ciclo hipoxia-hiperoxia que se da normalmente durante el ejercicio para estimular el HIF? Finalmente, es posible que a las seis semanas de entrenamiento las respuestas mediadas por la hipoxia y el HIF sean mínimas, es decir, se hayan dado en las primeras semanas y el hecho de que la toma de muestras haya sido 24 horas después del último entrenamiento parece disminuir la posibilidad de encontrar algún aumento. In vivo es transitoria en diferentes tejidos la inducción del HIF-1 α ocasionada por una hipoxia de varias horas.⁶

Hay una larga lista de genes regulados por el HIF muchos de los cuales están involucrados en el crecimiento y la diferenciación;^{2,21} además, se sabe que el ejercicio regula la expresión de gran cantidad de genes, pero no se conocen los mecanismos exactos²² y se está en la búsqueda de los genes

maestros que controlan este fenómeno, porque su conocimiento ayudaría a entender, por ejemplo, cómo el ejercicio lleva a hipertrofia muscular. En este sentido, sería muy útil saber cuáles genes están regulados por el HIF en la célula muscular (se conocen algunos de enzimas involucradas en la glucólisis, etc.) y evaluar con claridad si los productos de dichos genes se observan aumentados como adaptación al ejercicio y en los casos de hipertrofia muscular; así se descartaría o confirmaría la posibilidad de que el HIF medie parte de las respuestas musculares al ejercicio. Se necesitan estudios que evalúen la relación entre el HIF y los genes que este factor de transcripción regula con el aumento de las proteínas que se observa en el ejercicio agudo y el entrenamiento. Establecer cuáles son las cascadas intracelulares que se relacionan con la hipertrofia y el daño de los músculos, la insuficiencia cardíaca, los rabdomiosarcomas y las adaptaciones al ejercicio en general es un área que empieza a tener importancia mundial.²³

Es interesante entonces el hecho de que sólo el entrenamiento a alta intensidad bajo condiciones de hipoxia lleva a adaptaciones que incluyen la regulación al alza del HIF como mecanismo para compensar la disponibilidad reducida de oxígeno. Infortunadamente no se ha estudiado la cinética de estas proteínas a diferentes intensidades de actividad física.

Las anteriores observaciones, además, hacen que no sea muy claro el mecanismo de gastar energía degradando constantemente subunidades del HIF, puesto que los mamíferos están sometidos la mayor parte del tiempo a la normoxia. Queda la duda sobre si mecanismos más sencillos pudieran ser eficientes, como, por ejemplo, tener reserva de HIF sintetizado y activarlo mediante la acción de un solo tipo de hidroxilasas. Se podría pensar que este gasto de energía es para poder responder rápidamente a los efectos de la hipoxia;^{4,21} sin embargo, los pocos resultados de los experimentos en músculos y en deportistas no permiten evaluar tales hipótesis en

este tipo de células. Si la hipótesis propuesta fuera cierta, los breves momentos de hipoxia durante el ejercicio serían percibidos rápidamente por la célula y se deberían medir los aumentos del HIF después de una contracción isométrica máxima de varios minutos, por ejemplo; sin embargo, los trabajos realizados no han evaluado esta forma de regulación del HIF, sino que han estudiado su regulación postranscripcional. A pesar de este análisis se deben considerar además otros aspectos, como que la vida media del HIF es menor de cinco minutos⁴ o que el nivel de hipoxia muscular, cuando se hace ejercicio en un ambiente normóxico, puede no ser lo suficientemente importante como para alterar el mecanismo de regulación-degradación del HIF; por lo tanto, sería técnicamente difícil demostrar la activación e inactivación rápidas del HIF y de las hidroxilasas mencionadas.

Un trabajo reciente respondió parte de las preguntas arriba planteadas;²⁴ en él se evaluó la respuesta de los HIF-1 α y 2 α en el músculo vasto lateral de seres humanos después de hacer un ejercicio agudo de intensidad moderada y después de cuatro semanas de entrenamiento en un ambiente normóxico.

Sólo el ejercicio agudo indujo aumentos significativos en el ARNm de los HIF-1 α y 2 α aunque se observaron a las seis horas de la recuperación. Nótese que la duración del entrenamiento en este caso fue menor que en el trabajo discutido anteriormente (cuatro vs. seis semanas).

Si se asume que durante la actividad física moderada o intensa la PiO_2 (PO_2 tisular) puede ser tan baja como de 4 mm Hg —normalmente es de 8 mm Hg—²⁴ y que con el entrenamiento se inhibe el aumento del HIF-1 α inducido por el ejercicio agudo (según se deduce del hecho de que el ejercicio crónico no causa, a diferencia del ejercicio agudo, aumento significativo en el ARNm del HIF-1 α), se podría pensar que: (i) el entrenamiento reduce la hipoxia observada luego de un ejercicio agudo, por lo que no se observa el aumento del HIF-1, o (ii) la

hipoxia persiste pero de alguna manera el HIF-1 ya no es afectado por ella, lo cual significaría que el HIF y los mecanismos que lo regulan se adaptan y se hacen tolerantes a la hipoxia.

Otra hipótesis sería que el aumento del HIF, en este caso, no sea mediado por la hipoxia, sino por otros mecanismos.²⁴ Los radicales libres parecen ser mediadores de adaptaciones musculares²⁵ y cabe recordar que se los ha sugerido como mediadores de las respuestas a la hipoxia (y a la hiperoxia); por lo tanto, se justifica profundizar en la relación HIF-ERO en diferentes tipos de ejercicio llevado a cabo en forma aguda a diferentes intensidades y después de distintos números de semanas de entrenamiento, evaluando prospectiva y paralelamente la respuesta del HIF y la producción de ERO. El óxido nítrico puede aumentar la expresión del HIF, de modo que ésta podría ser una vía de comunicación, en el músculo, entre la hipoxia-hiperoxia, los radicales libres y el HIF.

No se encontraron trabajos en una búsqueda en bases de datos acerca del efecto del ejercicio realizado en forma aguda y del entrenamiento sobre la expresión y actividad de las hidroxilasas (PHD y FIH) involucradas en la regulación del HIF. Tampoco se encontraron trabajos que evaluaran la respuesta (la regulación postransduccional) de las subunidades HIF-1 α y β en el músculo esquelético bajo diferentes condiciones.

Aún quedan muchos interrogantes que requieren respuesta para poder entender mejor la relación hipoxia-HIF-ERO. El músculo esquelético podría ser un modelo importante y poco explorado para resolver estos y otros interrogantes. ¿Tiene algún papel, por ejemplo, el HIF en el desarrollo de la fatiga muscular en ejercicios de larga duración? Se sabe, por ejemplo, que regula varias proteínas involucradas en la utilización de glucosa para obtener energía y que la producción de lactato, el daño muscular y la resistencia a la fatiga se

ven afectados en las células musculares de ratones que no expresan la proteína HIF-1 α .²⁶ Su papel en la regulación de enzimas clave de la glucólisis, así como el de la mitocondria como sensor o posible enlace entre las ERO y el HIF, puede ser estudiado en el músculo esquelético.²⁷ La pregunta de si una célula responde a la depleción energética (disminución de ATP y fosfocreatina) en forma parecida a como lo hace ante la falta de oxígeno²⁸ puede ser abordada utilizando el tejido muscular.

Aclarar la relación entre hipoxia-ERO-HIF y eventos como la inducción de genes, la muerte celular, etc., puede tener a largo plazo aplicaciones médicas importantes. Se han descrito múltiples alteraciones de importancia fisiopatológica que involucran el sistema HIF-prolil y asparaginil hidroxilasas, como la enfermedad pulmonar crónica, la apnea del sueño, las masas tumorales como el carcinoma renal, el choque hemorrágico, la anemia, la insuficiencia cardíaca, la enfermedad cerebrovascular, etc.²⁸

En conclusión, el modelo muscular permitiría el estudio del HIF y de los mecanismos reguladores de una forma que no se puede hacer en otro tipo de células, dado que la célula muscular genera ERO y modifica la expresión del HIF y de otras proteínas relacionadas con el mecanismo que percibe los cambios de oxígeno y responde a ellos como consecuencia de su actividad fisiológica contráctil. Su estudio puede tener implicaciones básicas y clínicas importantes. Los pocos trabajos que estudian la respuesta del HIF al ejercicio generan múltiples interrogantes y abren puertas para explorar la relación hipoxia-ERO-HIF-respuesta celular en el modelo propuesto.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Hilda Nora Jaramillo por la revisión crítica del texto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Maxwell PH. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol* 2005; 90: 791-797.
2. Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 2000; 203: 1253-1263.
3. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 167-171.
4. Hirota K, Semenza GL. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 610-616.
5. Semenza GL. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol* 2006; 91: 803-806.
6. Wiener CM, Booth G, Semenza GL. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225: 485-488.
7. Astrand P, Rodahl K. Fisiología del trabajo físico (3ª ed). Bogotá: Editorial Médica Panamericana; 1992.
8. Stainsby WN, Brechue WF, Ameredes BT, O'Drobinak DM. Fatigue of mammalian skeletal muscle in situ during repetitive contractions. *Can J Physiol Pharmacol* 1991; 69: 226-229.
9. Bystrom SE, Kilbom A. Physiological response in the forearm during and after isometric intermittent handgrip. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1990; 60: 457-466.
10. Clanton TL, Zuo L, Klawitter P. Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 253-262.
11. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol* 1978; 45: 927-932.
12. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107: 1198-1205.
13. Kanter MM, Nolte LA, Holloszy JO. Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise. *J Appl Physiol* 1993; 74: 965-969.
14. Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* 1995; 79: 675-686.
15. White CW. Commentary on "Hypoxia, hypoxic signaling, tissue damage, and detection of reactive oxygen species (ROS)". *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 923-927.
16. Zerba E, Komorowski TE, Faulkner JA. Free radical injury to skeletal muscles of young, adult, and old mice. *Am J Physiol* 1990; 258: C429-435.
17. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS. Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol* 1992; 73: 1797-1804.
18. Acker H. The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005; 360: 2201-2210.
19. Hoppeler H, Vogt M. Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol* 2001; 204: 3133-3139.
20. Vogt M, Puntschart A, Geiser J, Zuleger C, Billeter R, Hoppeler H. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol* 2001; 91: 173-182.
21. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005; 105: 659-669.
22. Carson JA, Wei L. Integrin signaling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2000; 88: 337-343.

23. Calderón J. Carta al editor. *Colomb Med* 2006; 37: 169-170.
24. Lundby C, Gassmann M, Pilegaard H. Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1alpha and HIF-2alpha mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. *Eur J Appl Physiol* 2006; 96: 363-369.
25. Jackson MJ, Pye D, Palomero J. The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2007; 102: 1664-1670.
26. Mason SD, Howlett RA, Kim MJ, Olfert IM, Hogan MC, McNulty W, et al. Loss of skeletal muscle HIF-1alpha results in altered exercise endurance. *PLoS Biol* 2004; 2: e288.
27. Wenger RH. Mitochondria: oxygen sinks rather than sensors? *Med Hypotheses* 2006; 66: 380-383.
28. Caramelo C, Peña Deudero JJ, Castilla A, Justo S, De Solis AJ, Neria F, et al. Respuesta a la hipoxia. Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica. *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 155-164.

